

## RESISTENCIA A IPROBENPHOS, EDIFENPHOS E ISOPROTHIOLANE EN POBLACIONES DE *PYRICULARIA GRISEA* CAV. EN ARROZ

L. Pérez y A. Hernández

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F,  
Playa, Ciudad de La Habana. CP 11600

### RESUMEN

Se realizaron colecciones de poblaciones de *Pyricularia grisea* de diferentes campos de la Granja Caribe del CAI Los Palacios, en Pinar del Río. Se obtuvieron aislados monospóricos de estas colecciones, los que fueron utilizados en ensayos de sensibilidad a los fungicidas iprobenphos, edifenphos e isoprothiolane. La sensibilidad de los aislados a los fungicidas iprobenphos, edifenphos e isoprothiolane fue determinada mediante la inhibición del desarrollo micelial de las colonias sembradas en agar de papa dextrosa envenenado con los fungicidas a las concentraciones de 0; 0,5; 0,75; 1; 10; 15; 20; 30; 35; 40; 45 µg/mL de ingrediente activo. Se sembró un disco de micelio de 5 mm en el centro de las placas, y se incubaron a 27°C durante ocho días, momento en que se midió el diámetro de las colonias y fueron calculados los porcentajes de inhibición respecto al testigo no tratado. Se calcularon las  $DE_{50}$  y  $DE_{95}$  de cada aislado. Los resultados demuestran la existencia de poblaciones del hongo, con un factor de resistencia de 4 a los fungicidas iprobenphos e edifenphos. Los factores de resistencia al isoprothiolane fueron más bajos en correspondencia con los antecedentes existentes. Estos resultados de laboratorio se corresponden con las observaciones de baja eficacia obtenidas con tratamientos en campo en la empresa. Se recomienda extender el estudio con poblaciones de diferentes empresas del país.

Palabras claves: *Pyricularia grisea*, *Oryza sativa*, resistencia, fungicidas

### ABSTRACT

Samples of leaves affected with *Pyricularia grisea* in different rice fields of the Caribe farm of the CAI Los Palacios in Pinar del Río, were collected. Monosporic isolates were obtained of these collections and used in mycelial growth tests of sensibility to the fungicides iprobenphos, edifenphos and isoprothiolane. The tests were carried out in agar potato dextrose amended with the fungicides at the concentrations of 0, 0.5, 0.75, 1, 10, 15, 20, 30, 35, 40, 45 (g of active ingredient/ml). A disk of micelia of 5 mm was inoculated in the center of the plates and were incubated at 27 °C during 8 days and after measured the diameter of the colonies and calculated the percentage of inhibition with regard to the non fungicide amended control plates. The  $DE_{50}$  and  $DE_{95}$  of the fungicides to each isolate were determined. The results show the existence of *P. grisea* populations, with a resistance factor of 4 to the fungicides iprobenphos and edifenphos. The factors of resistance obtained to isoprothiolane were lower than the reported ones. The laboratory results agree with the observations of low effectiveness obtained with treatments in field. It is recommended to extend this study to other populations of different rice plantations of the country.

Key words: *Pyricularia grisea*, *Oryza sativa*, resistance, fungicides

### INTRODUCCIÓN

La principal enfermedad del arroz en Cuba es el tizón foliar y la pudrición del cuello de las espigas y de la panícula por *Pyricularia grisea*. En la Granja Caribe del CAI Los Palacios, durante 1997 fueron observadas incidencias superiores al 50% de los tallos atacados por el patógeno (informe no publicado) en diferentes áreas de esta granja. Las altas incidencias fueron relacionadas a las deficiencias fisiológicas que sufre el cultivo debido al estado nutricional de los suelos, a la susceptibilidad de las variedades cultivadas, a la falta de desinfección de semillas durante un número considerable de años, a una inadecuada ejecución en tiempo de los tratamientos y a la posible pérdida de sensibilidad de los fungicidas para tratamientos foliares en uso.

Para el control de la enfermedad durante más de 15 años ha venido utilizándose casi exclusivamente en la totalidad de las arroceras de Cuba los fungicidas derivados de fosfotiolatos iprobenphos e edifenphos, el isoprothiolane, y en algunas ocasiones ditiocarbamatos. De esta forma es casi imposible encontrar poblaciones que no hayan sido sometidas a tratamientos con fosfotiolatos o isoprothiolane.

Existe un gran número de informes de resistencia de *P. grisea* a los fosfotiolatos en Japón y Corea [Katagiri y Uesugi, 1977; Katagiri *et al.*, 1980; Takamatsu, 1981; Uesugi, 1981; Nakagawa y Umehara 1981; Iijima y Uesugi 1983; Gol *et al.*, 1983; Kan y Matsusaki, 1983;

Osada, 1983; Osada y Inouye 1981; Taga *et al.*, 1982; Peng *et al.*, 1993]

En una información primaria, Kakiki *et al.*, en 1969, según Braun y Schreiber (1995) y Maeda *et al.* (1970), informaron de la inhibición de la síntesis de quitina como uno de los mecanismos de acción de los fosfotiolatos. Más tarde De Waard (1972 y 1974) determinó que la actividad principal estaba relacionada con la eliminación del ortofosfato de células miceliales, y que por tanto el efecto primario es la afectación de la permeabilidad de la membrana, y la consecuencia era la inhibición de síntesis de quitina en la membrana celular. Kaars Sijpesteijn (1982) determinó que los fosfotiolatos y el isoprothiolane inhiben la formación de fosfatidilcolina, componente importante de la membrana a través del bloqueo de la fosfolípido N-metil transferasa [Akatsuka *et al.* 1977; Kodama *et al.*, 1979; Kodama *et al.*, 1980] en el pathway de la síntesis de fosfolípidos en *P. grisea*.

Hay noticias de existencia de resistencia cruzada entre el isoprothiolane, el iprobenphos y el edifenphos en ensayos de laboratorio [Katagiri y Uesugi, 1977; Iijima, 1985; Peng Yunliang, 1994].

Uesugi (1980) detalló que la concentración mínima inhibitoria (CMI) del edifenphos sobre el crecimiento micelial de cepas salvajes de *P. Oryzae* está entre 31 y 60 µg/mL, la del iprobenphos entre 29 y 58 µg/mL, y la del isoprothiolane entre 29 y 58 µg/mL.

Anon (1980) expone que la DL<sub>50</sub> del isoprothiolane sobre aislados de *P. oryzae* de Corea, Taiwán, Colombia, Brasil y Uruguay, varió entre 5 y 10 µg/mL, y la CMI entre 20 y 50 µg/mL.

H. Sawada [Comunicación personal, Bayer, Japón], dice que la CMI base de la sensibilidad (crecimiento de

aislados salvajes de *P. grisea* en PDA) para iprobenphos está en el rango de 10-20 µg/mL. Para edifenphos está entre 3-10 µg/mL, y para isoprothiolane entre 10-25 µg/mL, mientras que las CMI de los aislados resistentes problemáticos en campo en monitoreos realizados en Japón fueron entre 20-50, 10-40 y 25-50 µg/mL para el iprobenphos, el edifenphos y el isoprothiolane respectivamente. Asimismo informó que las cepas resistentes que predominan en el campo pueden tener un factor de resistencia entre 2-5, y que raramente son observados aislados con una «alta resistencia» (> 100 µg/mL).

El objetivo del presente estudio fue determinar la sensibilidad de las poblaciones de *P. grisea* presente en las arrozceras de la granja Caribe del CAI Los Palacios de Pinar del Río, a los fungicidas iprobenphos, edifenphos e isoprothiolane.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Durante la estación lluviosa de 1998 se realizaron muestreos de plantas afectadas de tizón foliar y pudrición del cuello por *Pyricularia grisea* en campos de arroz de la Granja Caribe del CAI arrozero Los Palacios, en la provincia de Pinar del Río. De los síntomas de las muestras tomadas se realizaron aislamientos del patógeno, para lo cual fragmentos de lesiones en hojas y de las espigas fueron desinfectados superficialmente con hipoclorito de sodio, sembrados en agar agua e incubados hasta observar la aparición de micelio del patógeno. Se realizaron aislamientos a tubos con agar de papa dextrosa que fueron incubados por 10 días a 27-30 °C, a partir de los cuales se prepararon cultivos monoconidiales de cada uno de los aislados. La relación de los aislados aparece en la *Tabla 1*.

**Tabla 1. Sensibilidad de las poblaciones de *Pyricularia grisea* de la granja Caribe del CAI Los Palacios a los fungicidas iprobenphos, edifenphos e isoprothiolane**

Aislados	DE <sub>50</sub> (µg/mL)			DE <sub>99</sub> (µg/mL)		
	Isopr.	Iprob.	Edifen.	Isopr.	Iprob.	Edifen.
63,2	3,9	13,3	4,8	35,6 *	56,3 *	30,4 (-)
63,5	4,2	6,8	3,6	38,0 *	32,9	28,4
M2	6,9	12,6	9,9	21,9	52,6 *	25,9
K3	10,1	24,8	9,4	32,7 *	117,7 **	30,0 (-)
CH3	8,9	39,7	12,9	29,4 *	159,1 **	45,8 (*)
M9	9,9	—	—	28,8	—	—
Datos de referencia:				CMI		
Katagiri <i>et al.</i> (1980)				28	29	30
Sawada [Comunicación personal, 1998, Bayer, Japón]						
• CMI base (sensibles)				10-15	10-20	3-10
• Aislados resistentes en campo				25-50	20-50	10-40

\*Aislados resistentes

\*\*Aislados muy resistentes

La sensibilidad de los aislados a los fungicidas iprobenphos, edifenphos e isoprotiolane fue determinada mediante la inhibición del desarrollo micelial de las colonias sembradas en agar de papa dextrosa envenenado con los fungicidas a las concentraciones de 0; 0,5; 0,75; 1; 10; 15; 20; 30; 35; 40; 45  $\mu\text{g/mL}$  de ingrediente activo. Se sembró un disco de micelio de 5 mm en el centro de las placas, y se incubaron a 27°C durante ocho días, momento en que se midió el diámetro de las colonias y fueron calculados los porcentajes de inhibición respecto al testigo no tratado. Los datos de inhibición de crecimiento fueron transformados a unidades probit de inhibición, y las concentraciones a log de concentraciones. Se determinaron las  $\text{DE}_{50}$  y  $\text{DE}_{99}$  para cada aislado mediante el programa probit del INISAV desarrollado en el propio instituto.

Debido a la imposibilidad de obtener aislados sensibles que no hayan estado en contacto con estos fungicidas, se utilizaron valores de referencias de cepas salvajes obtenidas de las informaciones dadas por Sawada [Comunicación personal], y Anón (1980).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la *Tabla 1* aparecen los resultados de los tests de sensibilidad de los aislamientos de *P. grisea* al isoprotiolane, el iprobenphos y el edifenphos. Al no disponerse de cepas salvajes que no hayan sido sometidas a tratamientos con estos fungicidas, se emplearon los valores informados por Katagiri *et al.* (1988) y Sawada [Comunicación personal, 1998] como valores bases de referencia.

Como puede apreciarse, cuatro de los cinco aislamientos estudiados mostraron valores altos de  $\text{DE}_{99}$  del iprobenphos, siendo clara la falta de sensibilidad de la población frente a este ingrediente activo. El factor de resistencia de los aislamientos mencionados se encontró en el rango de 2-4 veces la CMI.

La mayoría de los aislados se encuentra alrededor del límite superior del rango de CMI informadas por Katagiri *et al.* (1980) y Sawada (1998) para el edifenphos. El aislado CH3 es resistente al edifenphos, mientras que los aislados 63,2 y K3 pueden ser considerados débilmente insensibles.

Si comparamos los valores  $\text{DE}_{99}$  obtenidos del isoprotiolane para los diferentes aislados con los valores de referencia, podemos llegar a la conclusión de que la mayoría de ellos muestran algún grado de insensibilidad a este fungicida, y que el único aislado sensible es el M2. El factor de resistencia está entre 1-2, lo que concuerda con los comentarios de Uesugi (1981) y Sawada [Comunicación personal] de que no hay grandes diferencias de CMI entre los aislados que dan problemas en el campo y los sensibles.

Los aislamientos CH3, K3 y 63,2 resultaron resistentes o insensibles a los tres ingredientes activos, por lo que

puede confirmarse las observaciones de Katagiri y Uesugi (1977), Iijima, (1985) y Peng (1994), de la posibilidad cruzada en *P. grisea* a estos fungicidas. Sin embargo, esto no fue observado en todos los casos.

En la práctica, los aislados CH3, K3 y 63,2 presentaron fuertes índices de infección en las parcelas, lo que provocó defoliaciones a pesar de los tratamientos realizados.

El aislado CH3 puede considerarse como referencia de resistencia a los tres fungicidas. El aislado 63,5 puede ser utilizado como referencia de sensibilidad al edifenphos y al iprobenphos, mientras que el aislado M2 puede ser tomado como referencia de sensibilidad al isoprotiolane.

Los resultados permiten aseverar que uno de los factores de la alta incidencia de *Pyricularia grisea* en el CAI Los Palacios es la pérdida de sensibilidad del patógeno a estos tres fungicidas, debido a su uso continuado por más de quince años. Se requiere por tanto establecer nuevas estrategias de manejo de la enfermedad basándose en la rotación de ingredientes activos de diferentes mecanismos de acción bioquímico.

Con este antecedente presente, sería recomendable estudiar la sensibilidad de las poblaciones de *P. grisea* presentes en otros CAI arroceros del país.

## CONCLUSIONES

- Los resultados demuestran la existencia de poblaciones del hongo, con un factor de resistencia de 4 a los fungicidas iprobenphos e edifenphos. Los factores de resistencia al isoprotiolane fueron más bajos en correspondencia con los antecedentes existentes. Estos resultados de laboratorio se corresponden con las observaciones de baja eficacia obtenidas con tratamientos en campo en la empresa. Se recomienda extender el estudio con poblaciones de diferentes empresas del país.

## REFERENCIAS

- Anónimo: *Fuji-One (isoprotiolane)*. Technical Information, Nihon Noh-yaku Co. Ltd. Tokyo, 1980.
- Akatsuka, T.; O. Kodama; H. Yamada: «A Novel Mode of Action of Kitzin P. in *Pyricularia oryzae*», *Agric. Biol. Chem.* 41: 2111 - 2112, 1977.
- Braun, P.; B. Schreiber: «Organophosphorus Fungicides», *Modern Selective Fungicides*, Ed. Springer Verlag, 1995.
- De Waard, M. A.: «On the Mode of Action of the Organophosphorus Fungicide Hinosan Neth», *J. Plant. Pathol.* 78: 186-187, 1972.
- : «Mechanism of Action of the Organophosphorus Fungicide Ppyrazophos Neth», *J. Plant. Pathol.* 74: 1-97, 1974.
- Goh, N.; T. Yaoita; K. Aoyagi: «Studies on Drug-Resistant Strains of Rice Blast Fungus *Pyricularia oryzae* Cava, 2: Distribution of Drug-Resistant Strains and Its Determination Factors», *Journal of Niigata Agricultural Experiment Station (Japan)*, 32 (Mar): 33- 44, 1983.

- Kaars Sijpesteijn, A.: «Mechanism of Action of Fungicides». *Fungicide Resistance in Crop Protection*, Ed. Pudoc, Wageningen 32, 1982.
- Kan, M.; M. Matsuzaki: «Appearance of Resistant Strains of *Pyricularia oryzae* Against Organophosphorus Fungicides in Saga Prefecture [Japan]», *Proceedings of the Association for Plant Protection of Kyushu* (Japan), (Oct. 1983) 29: 3-6, 1983.
- Katagiri, M.; M. Uesugi: «Similarities Between the Fungicidal Action of Isoprothiolane and Organophosphorous Thiolate Fungicides», *Phytopathology* 67: 1415-1417, 1977.
- Katagiri, M.; Y. Uesugi; Y. Umehara: «Development of Resistance to Organophosphorus Fungicides in *Pyricularia oryzae* [Causal Fungus of Rice, *Oryza sativa*] in the Field», *Journal of Pesticide Science* (Japan) 5 (3): 417-421, 1980.
- Kodama, O.; H. Yamada; T. Akatsuka: «Kitazin P. Inhibitor of Phosphatidylcoline Biosynthesis in *Pyricularia oryzae*», *Agric. Biol. Chem.* 43: 1719-1725, 1979.
- Kodama, O.; K. Yamashita; T. Akatsuka: «Edifenphos Inhibitor of Phosphatidylcoline Biosynthesis in *Pyricularia oryzae*», *Agric. Biol. Chem.* 44: 1015-1021, 1980.
- Iijima, A.: «Studies on Drug-Resistant Strains of Rice Blast Fungus, *Pyricularia oryzae* Cavara, 4: Effects of Chemical Control on Population Shift of IBP-Resistant Strains in Nursery Bed and Paddy Field», *Proceedings of the Association for Plant Protection of Hokuriku* (Japan), (Dec 1983), (31): 64-68, 1983.
- : «Studies on Drug-Resistant Strains of Rice Blast Fungus, *Pyricularia oryzae* Cavara 6: Cross Resistant to IBP, EDDP and Isoprothiolane», *Proceedings of the Association for Plant Protection of Hokuriku* (Japan), (Dec. 1985), (33):70-73, 1985.
- Maeda, T. H.; H. Abe; K. Kakiki; T. Misato: «Studies on the Mode of Action of Organophosphorus Fungicide Kitazin. II Accumulation of an Aminosugar Derivative on Kitazin Treated Mycelia of *Pyricularia oryzae*», *Agric. Biol. Chem.* 34: 700-709, 1970.
- Nakagawa T.; Y. Umehara: «Investigation of Drug Resistant Strains of Rice Blast Fungus, *Pyricularia oryzae* Cavara, in Toyama Prefecture [Japan], 2: Cross-Resistance to IBP, Isoprothiolane and Edifenphos on Isolates Collected from Paddy Fields», *Proceedings of the Association for Plant Protection of Hokuriku* (Japan), (Dec 1981), (29): 60-63, 1981.
- Osada, S.: «Studies on the Drug-Resistant Strains of *Pyricularia oryzae* Cavara, 3: Effect of Granular Fungicides by Submerged Application on Population Change in Resistant Strains of Rice Blast Fungus, *Pyricularia oryzae* Cav., to Kasugamycin and IBP», *Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan* (Japan), (Oct.1983), (34): 95-97, 1983.
- Osada S.; T. Inouye: «Studies on the Drug-Resistant Strains of *Pyricularia oryzae* Cavara, 2: Control Effect of Some Fungicides on Rice Relation to Prevalence of Kasugamycin and IBP Resistant Rice Blast Fungus Strains», *Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan* (Japan), (Dec 1981), (32): 102-104, 1981.
- Peng, Yunliang; Liu Jinfeng; Ye Zhongyin: «Studies on Tolerance of *Pyricularia oryzae* Cav. to Isoprothiolane», *Acta-Phytophylacica-Sinica* (China), 20 (1): 77-81, 1993.
- Peng Yunliang: «Cross-Resistance to Organophosphorus Fungicides and Resistant Mechanism in *Pyricularia oryzae*», *Southwest China Journal of Agricultural Sciences* (China), 7 (1): 55-58, 1994.
- Taga, M.; T. Waki; M. Tsuda; A. Ueyama: «Fungicide Sensitivity and Genetics of IBP [S-benzyl Diisopropyl Phosphorothiolate] Resistant mutants of *Pyricularia oryzae*», *Phytopathology* 72 (7): 905-908, 1982.
- Takamatsu, S.: «Mode of Occurrence of IBP-and Kasugamycin-Resistant Strains of *Pyricularia oryzae* Cavara in Fukui Prefecture (Japan)», *Proceedings of the Association for Plant Protection of Hokuriku* (Japan), (Dec. 1981), (no. 29): 64-67, 1981.
- Uesugi Y.: «Resistance to Fungicides in *Pyricularia oryzae* [Causal Fungus of Blast Disease of Rice Plants]», *Journal of Pesticide Science* (Japan), 6 (2): 239-246, 1981.
- : *Mechanisms of Fungicide Resistance: With Special Reference to Organophosphorus Fungicides [Pyricularia oryzae]*, *Pest Resistance to Pesticides*, New York (USA), Plenum Press, 1983, pp. 481-503.
- Yu, G. H.; K. H. Lee; C. S. Kang: *Occurrence of Tolerance of Rice Blast Fungus, Pyricularia oryzae to Fungicides*, Research Reports of the Office of Rural Development (Korea R.) (Oct 1983,25 (S.P.M.U): 109-115, 1984.